

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

26. 01. 2005



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 53 593.4

Anmeldetag: 17. November 2003

Anmelder/Inhaber: Klinikum der Universität München,
80337 München/DE

Bezeichnung: Leptinantagonist und Verfahren zur quantitativen
Messung von Leptin

IPC: C 07 K, A 61 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. Dezember 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

HeiB

5

Anmelder:

Klinikum der Universität München
Großhadern - Innenstadt
Lindwurmstr. 2a
80337 München

10

15

Leptinantagonist und Verfahren zur quantitativen Messung von Leptin

- 20 Die Erfindung betrifft spezifische Antikörper, insbesondere einen Antikörper spezifisch gegen einen Leptin-Rezeptor (Leptin-R) oder ein Leptin-Bindungsprotein (Leptin-BP), sowie die Verwendung dieses Antikörpers bei der quantitativen Analyse, in ausgewählten Indikationen für therapeutische Zwecke und zur Herstellung von Therapeutika. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur quantitativen
- 25 Bestimmung von Leptin in der Probe gelöster oder suspensierter Leptin-Bindungsproteine unter Verwendung spezifischer Antikörper, sowie Diagnostika und (Diagnostik-) Kits enthaltend diesen Antikörper.

- 30 Leptin (abgeleitet vom griechischen Wort leptos = dünn) ist ein Eiweißhormon, das primär von den Fettzellen (Adipozyten) sezerniert wird. Leptin wurde 1994 (Zhang et al. (1994) Nature 372, 425) als ungefähr 16 kDa und aus 146 Aminosäuren bestehendes Genprodukt des obese Genes (ob Gen) entdeckt und spielt eine wichtige Rolle im Energiehaushalt (Friedman et al., (1998) Nature 395, 763 – 770). Neben der Bedeutung für den Energiestoffwechsel wurden mittlerweile wei-

terhin seine Beteiligung an der Modulation von immunkompetenten Zellen (Lord et al., (1998) Nature 394, 6696) oder hämatopoetischen Zellen (Sierra-Honigmann et al., (1998) Science 281, 1683-1686) und eine permissive Funktion bei der Pubertätsinduktion (Quinton et al., (1999) J Clin Endocrinol Metab 84(7), 2336-41) beschrieben.

Das Fehlen des Leptingens führt bei Mäusen (*ob/ob* Maus) zu massivem Übergewicht (Adipositas). Aufgrund der Tatsache, dass die Zugabe von Leptin zu *ob/ob* Mäusen zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme und schließlich zu einem Gewichtsverlust führte, wurde dem Leptin eine Rolle als Appetitzügler zugesprochen. Die Zusammenhänge sind allerdings weit komplexer.

Die Wirkung des Leptin wird über den Leptin-Rezeptor (Leptin-R) (Tartaglia et al., (1995) Cell 83(7), 1263-71) vermittelt und führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden. Der Leptin-Rezeptor gehört zur sogenannten Klasse I der Cytokine Rezeptor Superfamilie. Bei vielen Rezeptoren dieser Familie, so auch dem Leptin-Rezeptor, zirkuliert ein extrazelluläre Anteil des Leptin-Rezeptors als Leptin-Bindungsprotein im Blut.

Ein Leptin-Rezeptordefekt konnte auch beim Menschen als ein Grund für Übergewicht identifiziert werden (Clement et al., (1998) Nature 392, 398 – 401). Umgekehrt scheinen Patienten mit Anorexia nervosa (Magersucht) im Verhältnis zur reduzierten Fettmasse erhöhte Leptinwerte zu haben. Die Bestimmung der Konzentration von Leptin im Blut oder in Serumproben ist daher ein wesentliches diagnostisches Werkzeug zur Abklärung der Ursache von Essstörungen oder extremer Fettleibigkeit.

Die quantitative Bestimmung von Leptin aus einer Probe und insbesondere einer physiologisch in Körperflüssigkeiten - wie z.B. dem Blut - ist ein hochrangiges therapeutisches Ziel und ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel der Medizin. Viele dieser physiologischen Verbindungen, wie z.B. Hormone und andere Botenstoffe,

binden spezifisch an sogenannte Bindungsproteine oder Rezeptoren, die vielfach selbst in der Flüssigkeit - wie z.B. dem Blut - gelöst oder suspendiert sind. Damit besteht aber beispielsweise die Gefahr, dass sich vor oder während der Wirkungsentfaltung oder auch der quantitativen Bestimmung ein Komplex aus zu messender Verbindung, nämlich den zu bestimmenden Leptin (Ligand) und dem Leptin-Bindungsprotein bildet und somit die Wirkung des Liganden beeinflusst oder auch der Ligand einer Messung entzogen wird. Auch bei Messverfahren, bei denen der Probe zu Zwecken der Messung ein markierter Ligand zugesetzt wird, besteht die Gefahr, dass das Bindungsprotein den markierten Liganden der Lösung und damit der Messung entzieht. Damit kommt es häufig zu einer deutlichen Interferenz des Bindungsproteins in der quantitativen Messung und Diagnostik.

In Zeiten, in denen Energiestoffwechselstörungen, insbesondere Essstörungen, wie Anorexia nervosa (Magersucht) häufiger auftreten, ist es von großem Interesse und wirtschaftlicher Bedeutung, wirksame Leptin-Antagonisten zu identifizieren, welche die Funktion von Leptin vermindern, hemmen oder auch blockieren können.

Mit derartigen Leptin-Antagonisten könnten durch eine selektive Blockade des Leptin-Rezeptors und/oder durch Verdrängung von Leptin von Leptin-Bindungsproteinen physiologische Regulationsmechanismen und spezifische Effekte des Leptins *in vitro* untersucht werden. Darüber hinaus können ebenfalls schädliche Auswirkungen eines unerwünschten, unphysiologischen Leptinspiegels *in vivo* behandelt werden.

Da geeignete Substanzen, die spezifisch mit Leptin interagieren nicht zur Verfügung stehen, sind zunächst schon einmal keine eindeutigen Messwerte über den physiologischen Leptinspiegel zu erhalten, denn aufgrund des löslichen Leptin-Bindungsproteins werden alle Messwerte durch Interferenzen zwischen Leptin und dem Leptin-Bindungsprotein verfälscht.

In der Regel werden für die Analyse der Leptinkonzentration sogenannte Immunoassays benutzt. Diese beruhen auf dem Prinzip der Interaktion von spezifischen Antikörpern mit einem Analyten. Es werden wahlweise auch kompetitive Assays verwendet (wie der Radioimmunoassay, RIA), bei denen markiertes Leptin mit dem in der Probe vorhandenen Leptin um die Bindung an einen Antikörper konkurriert und somit ein zur Konzentration des zu messenden Analyten umgekehrt proportionales Signal entsteht. Am häufigsten jedoch werden inzwischen Sandwich-Immunoassays eingesetzt, bei denen ein immobilisierter spezifischer Antikörper den Analyten bindet („Fangantikörper“), und ein zweiter, gegen ein unterschiedliches Epitop des Analyten gerichteter markierter Antikörper dann den nun immobilisierten Analyten bindet. Hierdurch entsteht ein Signal, das proportional zur Menge des gebundenen Analyten ist. Das bekannteste Beispiel dieser Meßmethode ist der „enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA) mit einem kolorimetrischen Endpunkt, da regelmäßig das zur Messung nötige Photometer vorhanden ist. Andere Möglichkeiten der Signalgeneration sind Radioaktivität, Chemilumineszenz oder (zeitaufgelöste) Fluoreszenz.

Allen oben genannten Assaytechniken liegt das Prinzip der hochaffinen, spezifischen Bindung zwischen einem gegen ein bestimmtes Hormon - in diesem Fall Leptin - gerichteten Antikörper und dem Hormonmolekül in der zu analysierenden Probe zugrunde.

Der wesentliche Störfaktor für die Messung von Leptin in Serum oder Blut, ist das Vorhandensein eines hochaffinen Leptin-Bindungsproteins, nämlich dem löslichen extrazellulären Anteil des Leptin-Rezeptors, in humanem Serum. Der Effekt dieses Leptin-Bindungsproteins auf das Meßergebnis kann je nach verwendetem Assayprinzip (kompetitiver Assay oder Sandwich-Assay) zu falsch hohen oder falsch niedrigen Werten führen. Beim kompetitiven Assay kann einerseits markiertes Leptin (als sogenannter „Tracer“) durch das Leptin-Bindungsprotein gebunden und somit dem Assayansatz entzogen werden, was zu falsch hohen Konzentrationsangaben führt. Andererseits kann das Leptin-Bindungsprotein aber auch sterisch die Interaktion des spezifischen Antikörpers mit den Leptinmolekülen aus

einer Serumprobe behindern und somit ebenfalls zu falsch niedrigen Konzentrationen im kompetitiven Assay führen. Hingegen führt diese sterische Behinderung der Interaktion zwischen Antikörper und Hormon beim Sandwich-Immunoassay in der Regel zu falsch niedrigen Resultaten, da weniger Hormon oder weniger Detektionsantikörper gebunden wird. Besonders relevant wird der durch diesen Störfaktor entstehende Fehler bei den Meßergebnissen unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen, die mit einer Veränderung der Leptin-Konzentration im Blut einhergehen.

Um eine standardisierbare diagnostische Methode zu entwickeln, besteht daher ein erhöhter Bedarf selektive, spezifische und wirksame Substanzen bzw. Moleküle bereitzustellen, die an einen Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein binden.

Bislang sind nur wenige Substanzen bzw. Moleküle bekannt, welche die Anforderungen für eine selektive, spezifische und wirksame Bindung an einen Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein, erfüllen. Zum Beispiel berichtet Gonzales et al. (Gonzales et al., (2003) Mol Hum Reprod 9(3), 151-8) über einen polyklonalen Antikörper, der eine gewisse Blockade der Leptineffekte zu erlauben scheint. Solche polyklonalen Antikörper sind jedoch nicht reproduzierbar, nicht humanisierbar und auch nur in begrenzter Menge vorhanden.

Weitere Lösungsansätze für das Problem der Messungenauigkeiten betreffen einerseits methodische Extraktionsverfahren, die vor die eigentliche Messung geschaltet werden und z. B. die Leptin-Bindungsproteine zu eliminieren. Dies bedeutet jedoch einen erheblichen methodischen Mehraufwand und kann zu erheblichen Messungenauigkeiten führen. Insgesamt gibt es also im Stand der Technik noch keine befriedigende Lösung der Problematik löslicher Leptin-Bindungsproteine in zu analysierenden Proben zu eliminieren.

Es ist daher Aufgabe der im folgenden beschriebenen Erfindung, die Interaktion von insbesondere gelösten/m oder suspendierten/m Leptin-Bindungsprotein(en)

oder Leptin-Rezeptoren von dessen/deren Ligand(en) auf einfache Art zu vermindern oder verhindern.

5 Dieses geschieht durch eine Technik, mit deren Hilfe diese Testsysteme, insbesondere alle derzeit existierenden Assays für Leptin, unanfälliger für den Störfaktor des in bspw. Serumproben stets vorhandenen Leptin-Bindungsproteins - wie den extrazellulären Anteil des Leptin-Rezeptors - gemacht werden können. Ziel ist es, Erkrankungen und/oder Symptome zu diagnostizieren und zu behandeln, die mit einem Leptin-Überschuss einhergehen sowie ein Arzneimittel für derartige Diagnosen und/oder Therapien bereitzustellen.

10 Es ist den Erfindern der vorliegenden Erfindung gelungen ein Molekül - in Form eines Antikörpers - zu identifizieren und bereitzustellen, das spezifisch die Bindung von Leptin an einen Leptin-Rezeptor im wesentlichen verhindert und Leptin, welches an ein Leptin-Bindungsprotein gebunden ist, von diesem Leptin-Bindungsprotein zu verdrängen.

15 Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Antikörper A gegen einen Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein, dadurch gekennzeichnet, dass dieser die Interaktion des Leptin-Rezeptors und/oder des Leptin-Bindungsproteins mit einem Liganden im wesentlichen vermindert, vorzugsweise verhindert.

20 Der Begriff "Antikörper" umfasst im vorliegenden Sinne sowohl polyklonale, insbesondere polyklonale monospezifische Antikörper (d.h. Antikörper mit verschiedenen variablen Regionen, die jedoch alle ein spezifisches Epitop erkennen), als auch monoklonale, chimärische Antikörper, anti-idiotypische Antikörper (gerichtet gegen erfindungsgemäße Antikörper), die alle in gebundener oder löslicher Form vorliegen und ggf. durch "Label" (bspw. Fluoreszenzmarker, Goldmarker, angekoppelte Enzyme) markiert sein können, sowie auch Fragmente der vorgenannten Antikörper. Neben den Fragmenten von erfindungsgemäßen Antikörpern in Alleinstellung können erfindungsgemäße Antikörper auch in rekombinanter Form als Fusionsproteine mit anderen (Protein)-Bestandteilen auftreten. Fragmente als

solche oder Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern als Bestandteile von Fusionsproteinen werden typischerweise durch die Methoden enzymatischer Spaltung, der Protein-Synthese oder die dem Fachmann geläufigen Rekombinationsmethoden hergestellt. Als Antikörper werden nach der vorliegenden Erfindung
 5 also sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte oder rekombinante Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper bezeichnet.

Bei den polyklonalen Antikörpern handelt es sich um heterogene Mischungen von Antikörpermolekülen, die aus Seren von Tieren hergestellt werden, die mit einem Antigen immunisiert worden sind. Ein monoklonaler Antikörper enthält eine im Wesentlichen homogene Population von Antikörpern, die spezifisch gegen Antigene gerichtet sind, wobei die Antikörper im Wesentlichen gleiche Epitop-Bindungsstellen aufweisen. Die verschiedenen Antikörpervarianten mit Monospezifität können den nachfolgend beschriebenen Immunglobulinklassen angehören,
 15 es kann sich also um Mischungen von verschiedenen Haupt- oder Subklassen handeln, bevorzugt handelt es sich um eine homogene Mischung von IgG-Antikörpern. Diese Homogenität kann durch einen zusätzliche Reinigungsschritt (Immunopräzipitation, Chromatographie, bspw. über gegen IgG gerichtete Antikörper) erreicht werden.

Monoklonale Antikörper können durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren erhalten werden (z. B. Köhler und Milstein, Nature, 256, 495-397, (1975); US-Patent 4,376,110; Ausübel et al., Harlow und Lane "Antikörper": Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory (1988); Ausubel et al., (eds), 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)). Die in den
 25 vorgenannten Literaturstellen enthaltene Beschreibung wird als Bestandteil der vorliegenden Erfindung in die Offenbarung der vorliegenden Erfindung einbezogen. In kurzen Worten, man versteht unter monoklonal insbesondere das Produkt eines künstlichen Konstrukts, in welchem eine Antikörper-produzierende Zelle (B-Zelle) mit einer immortalisierten Krebszelle fusioniert wird (Hybridom), was zu ei-

ner Hybridomzelle führt. Daraus sind spezifische Antikörper zu gewinnen, die alle ausschließlich auf ein Epitop gerichtet sind. Ein Hybridom-Zellklon, der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper produziert, wird *in vitro* kultiviert.

- 5 Auch lassen sich gentechnisch manipulierte erfindungsgemäße Antikörper nach Verfahren, wie in den vorgenannten Druckschriften beschrieben, herstellen.

10 Erfindungsgemäße Antikörper können einer der folgenden Immunglobulinklassen angehören: IgG, IgM, IgE, IgA, GILD und ggf. einer Unterklasse der vorgenannten Klassen, wie die Subklassen des IgG oder deren Mischungen zu verstehen. Bevorzugt sind IgG und seine Subklassen wie beispielsweise IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 oder IgGM. Besonders bevorzugt sind die IgG Subtypen IgG1/k oder IgG2b/k.

- 15 Bei den erfindungsgemäßen chimärischen Antikörpern handelt es sich um Moleküle, die verschiedene Bestandteile enthalten, wobei diese sich aus verschiedenen Tierarten ableiten (z. B. Antikörper, die eine variable Region, die aus einem Mäuse-monoklonalen Antikörper abgeleitet ist, und eine konstante Region eines humanen Immunglobulins aufweisen). Chimärische Antikörper werden vorzugsweise eingesetzt, um einerseits die Immunogenizität bei der Anwendung zu reduzieren und andererseits die Ausbeuten bei der Produktion zu erhöhen, z.B. ergeben murine monoklonale Antikörper höhere Ausbeuten aus Hybridom-Zelllinien, führen aber auch zu einer höheren Immunogenizität beim Menschen, so dass human/murine chimärische Antikörper vorzugsweise eingesetzt werden. Chimärische Antikörper und Verfahren zu ihrer Herstellung sind aus dem Stand der
- 20
- 25 Technik bekannt (Cabilly et al., Proc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al. Nature 312 643-646 (1984); Cabilly et al., EP-A-125023; Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., EP-A-171496; Morrison et al., EP-A-173494; Neuberger et al., WO 86/01533; Kudo et al., EP-A-184187; Sahagan et al., J. Im-

munol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., WO 87/02671; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:214218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) und Harlow und Lane, Antikörper: A Laboratory Manual, wie oben zitiert. Diese Zitatstellen werden
5 als zur Offenbarung gehörig in die vorliegende Erfindung einbezogen.

Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper ist ein Antikörper, der eine Determinante, die im Allgemeinen mit der Antigenbindungsstelle eines erfindungsgemäßen Antikörpers assoziiert ist, erkennt. Ein anti-idiotypischer Antikörper kann durch die Immunisierung eines Tieres der gleichen Art und des gleichen genetischen Typs (z.B. eines Mäusestamms) als Ausgangspunkt für einen monoklonalen Antikörper, gegen welchen ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper gerichtet ist, hergestellt werden. Das immunisierte Tier wird die idiotypischen Determinanten des immunisierenden Antikörpers durch die Produktion eines Antikörpers, der gegen die idiotypischen Determinanten gerichtet ist (nämlich ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper), erkennen (U.S. 4,699,880). Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper kann auch als Immunogen eingesetzt werden, um eine Immunantwort in einem weiteren Tier hervorzurufen und um dort zur Produktion eines sog. anti-anti-idiotypischen Antikörpers zu führen. Der anti-anti-idiotypische Antikörper kann, muß aber nicht, bezüglich seiner Epitop-Konstruktion identisch mit dem originären monoklonalen Antikörper sein, der die anti-idiotypische Reaktion hervorgerufen hat. Auf diese Weise können durch die Verwendung von gegen idiotypische Determinanten eines monoklonalen Antikörpers gerichtete Antikörper andere Klone, die Antikörper von identischer Spezifität exprimieren, identifiziert werden.

25 Monoklonale Antikörper, die gegen ein in Körperflüssigkeiten gelöstes oder suspendiertes physiologisches Bindungsprotein eines physiologischen Liganden gerichtet sind, können eingesetzt werden, um die Bindung von anti-idiotypischen Antikörpern in entsprechenden Tieren, wie z. B. der BALB/c Maus, zu induzieren. Zellen aus der Milz einer solchen immunisierten Maus können verwendet werden,
30 um anti-idiotypische Hybridom-Zelllinien, die anti-idiotypische monoklonale Anti-

körper sekretieren, zu produzieren. Weiterhin können anti-idiotypische monoklonale Antikörper auch an einen Träger gekoppelt werden (KLH, "keyhole limpet hemocyanin") und dann verwendet werden, um weitere BALB/c-Mäuse zu immunisieren. Die Sera dieser Mäuse enthalten dann anti-anti-idiotypische Antikörper, die die Bindungseigenschaften der originären monoklonalen Antikörper haben und spezifisch für ein in Körperflüssigkeiten gelöstes oder suspendiertes physiologisches Bindungsprotein eines physiologischen Liganden (s. bevorzugte Beispiele unten). Die anti-idiotypischen monoklonalen Antikörper haben auf diese Weise ihre eigenen idiotypischen Epitope oder "Idiotope", die strukturell mit dem zu untersuchenden Epitop ähnlich sind.

Die Bezeichnung "Antikörper" soll sowohl intakte Moleküle als auch Fragmente derselben einschließen. Als Fragmente seien alle verkürzten oder veränderten Antikörperfragmente mit einer oder zwei dem Antigen-komplementären Bindungsstellen, wie Antikörperteile mit einer den Antikörper entsprechenden von leichter und schwerer Kette gebildeten Bindungsstelle wie Fv-, Fab- oder F(ab')₂-Fragmente oder Einzelstrangfragmente, genannt. Bevorzugt sind verkürzte Doppelstrangfragmente wie Fv-, Fab- oder F(ab')₂. Fab und F(ab')₂-Fragmente entbehren eines Fc-Fragments, wie etwa in einem intakten Antikörper vorhanden, so dass sie im Blutkreislauf schneller transportiert werden können und vergleichsweise weniger nicht-spezifische Gewebsbindung als intakte Antikörper aufweisen. Hierbei wird hervorgehoben, dass Fab und F(ab')₂ Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern bei einem erfindungsgemäßen Verfahren i.S. der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können. Solche Fragmente werden typischerweise durch proteolytische Spaltung hergestellt, indem Enzyme, wie z. B. Papain (zur Herstellung von Fab-Fragmenten) oder Pepsin (zur Herstellung von F(ab')₂-Fragmenten) verwendet werden, oder durch chemische Oxidation oder durch gentechnische Manipulation der Antikörpergene erhalten werden.

Weiterhin kann ein erfindungsgemäßer Antikörper auch weitere kovalent (oder nicht kovalent) angekoppelte Moleküle oder Gruppen aufweisen, bspw. eine Fluoreszenzmarkierung oder einen Label, bspw. einen Goldlabel, oder spezifische

Epitope, die von Drittmolekülen erkannt werden können. Weiterhin kann ein erfindungsgemäßer Antikörper auch bispezifisch sein, also mit seinen beiden Paratope unterschiedliche Epitope erkennen, vorzugsweise zwei verschiedene Epitope des gleichen Proteins oder Peptids (s.o.), ggf. können aber auch die beiden Paratope ihrer Struktur nach unterschiedlich sein, jedoch dasselbe Epitop oder zumindest überlappende Bereiche binden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne eines Leptin-Rezeptors, insbesondere gegen ein Leptin-Bindungsprotein gerichtet.

In einer weiterenbevorzugten Ausführungsform bindet der erfindungsgemäße Antikörper A auf einem Leptin-Bindungsprotein an die Bindungsstelle, an die der Ligand bindet. Weiterhin bevorzugt handelt es sich bei dem Ligand um Leptin.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Leptin-Bindungsprotein um ein in Flüssigkeit, vorzugsweise Körperflüssigkeit, gelöstes oder suspendiertes physiologisches Leptin-Bindungsprotein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Antikörper A um einen monoklonalen Antikörper. Weiterhin bevorzugt, handelt es sich um einen Antikörperbestandteil, vorzugsweise ein $F(ab')_2$ Fragment oder ein single-chain Antikörper (scFv) oder ein Antikörperfragment.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Mischungen von erfindungsgemäßen Antikörpern im oben genannten Sinne, bspw. Mischungen monoklonaler Antikörper oder Mischungen von monoklonalen Antikörpern mit Antikörperfragmenten, Mischungen anti-idiotypischer Antikörper etc. .

Besonders bevorzugt ist es, wenn der erfindungsgemäße Antikörper A der Antikörper ZMC2 ist. Der monoklonale Antikörper ZMC2 wurde mit Eingang vom 25.09.2003 anmelderseitig unter der Nummer DSM ACC2618 mit dem vom Hin-

terleger zugeteilten Bezugszeichen: ZMC2 nach Maßgabe des Budapester Vertrags bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) in Braunschweig in lebensfähiger Form hinterlegt.

- 5 Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Antikörper A humanisiert und gegen einen humanen Leptin-Rezeptor bzw. ein humanes Leptin-Bindungsprotein gerichtet ist. Die Humanisierung von Antikörpern ist im Stand der Technik bekannt und kann nach zahlreichen Standardverfahren erfolgen.

- 10 Es ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines Liganden in einer den Liganden und einen Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein - in gelöster oder suspendierter Form - enthaltenden Probe, bei der der zu messenden Probe der erfindungsgemäße Antikörper A zugesetzt wird.

- 15 Erfindungsgemäß kann der Antikörper A vor oder während, vorzugsweise vor, der quantitativen Bestimmung zugesetzt werden und/oder mit der Probe inkubiert werden.

- 20 Besonders bevorzugt im Rahmen der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Molekül, das exakt und mit hoher Affinität an die Stelle des Leptin-Bindungsproteins bindet, an die auch der Ligand bindet. Durch die Bindung des erfindungsgemäßen Moleküls, z.B. einen Antikörpers A, kommt es zu einer Verdrängung des Liganden (Leptin) vom Leptin-Bindungsprotein, wobei gleichzeitig auch eine erneute Bindung des Liganden verhindert wird. Diese Verdrängung fällt natürlich umso stärker aus, je größer die Menge zugesetzten Antikörpers A, insbesondere im Verhältnis zum Leptin-Bindungsprotein, ist, so dass meist ein großer Überschuss an Antikörpers A günstig ist.

- 30 Der durch die Verdrängung „freigesetzte“ Ligand (Leptin) kann dann ohne sterische Hemmung durch das Leptin-Bindungsprotein quantitativ gemessen werden.

Da der Antikörpers A selber nicht mit dem zur Messung vom Liganden (bspw. Leptin) evt. verwendeten „Anti-Liganden-Antikörpern“ B interferiert, entfällt die Notwendigkeit einer vorgeschalteten Entfernung der Antikörper-A/Leptin-Bindungsprotein-Komplexe aus der Probe. Vorteilhafterweise kann die Probe, abgesehen vom Zusatz des Antikörpers A und einer eventuellen Vorinkubation, genauso eingesetzt werden, wie für den jeweiligen Assay vom Hersteller beschrieben.

Unter „Leptin-Bindungsprotein“ bzw. „Bindungsprotein“ bzw. „Leptin-Rezeptor“ im Sinne dieser Erfindung sind alle Proteine zu verstehen, die mit hoher Affinität einen hier zu messenden Liganden binden können. Die hier relevanten Leptin-Bindungsproteine sind meist löslich, können jedoch auch Zellmembranständig sein bzw. liegen in der Probe als Suspension vor. Beispiele sind im Cytosol oder Blut auftretende Hormonbindungsproteine, bestimmte lösliche Rezeptoren oder Anteile von diesen, beispielsweise ein Leptin-Rezeptor, die extrazelluläre Domäne eines Leptin-Rezeptors, ein Leptin-Bindungsprotein. Beispiele für humane Sequenzen solcher Leptin-Bindungsprotein bzw. Bindungsprotein bzw. Leptin-Rezeptor sind die Sequenzen O95214, P48357 und O15243 (Quelle: Swiss-Prot/TrEMBL).

Bevorzugt handelt es sich um Leptin-Bindungsproteine bzw. Bindungsproteine bzw. Leptin-Rezeptoren humanen Ursprungs, von der vorliegenden Erfindung erfasst sind jedoch auch solche aller anderen Vertebraten, insbesondere Säugetiere, wie beispielsweise Ratte, Maus, Schwein, Pferd, Rind. Beispiele für derartige Sequenzen sind O02671, Q9MYL0, P48356, Q62959, O89013, Q9JLS8 (Quelle: Swiss-Prot/TrEMBL).

Unter „Ligand“ im Sinne dieser Erfindung sind alle Verbindungen zu verstehen, die mit hoher Affinität an einen Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein binden und deren Konzentration in bestimmten Assays gemessen werden kann und beispielsweise für medizinische Zwecke auch gemessen wird. Beispiele sind Botenstoffe, wie Hormone, Transmitter, bspw. Neurotransmit-

ter, extrazelluläre Signalpeptide oder -proteine, Cytokine, Chemokine, Lymphokine etc.. Ein bevorzugter Ligand der Erfindung ist Leptin.

5 Unter „Probe“ im Sinne dieser Erfindung ist jede Art von zu untersuchender Lösung zu verstehen, insbesondere aber Lösungen medizinisch relevanter Substanzen, wie z.B. Blut, Lymphe, Serum, Urin, Liquor, auch in für die Probenbearbeitung aufbereiteter Form.

10 Unter „in gelöster oder suspendierter Form“ ist im Sinne dieser Erfindung jede Form von Lösung des Leptin-Bindungsproteins oder des Liganden im weiteren Sinne im Lösungsmittel zu verstehen. Damit sind auch Situationen umfasst, in denen beispielsweise das Leptin-Bindungsprotein am Rand oder jenseits des Ausfallens ist, aber eben doch noch Bestandteil der Lösung ist.

15 „Antikörper“ sind im Sinne dieser Erfindung durch Vertebraten oder künstlich hergestellte Proteine oder evt. andere Strukturen, die mit hoher Affinität an eine bestimmte Oberflächenkonformation (Epitop) eines Antigens, also eines anderen Moleküls, binden, vorzugsweise mono- oder polyklonale (Teil)strukturen von Immunglobulinen (bspw. IgG, IgA, IgD, IgE) oder auch polyklonal monospezifische
20 Antikörper. Typischerweise enthalten derartige Antikörper zumindest den variablen Teil von Immunglobulinen, ggf. auch mindestens eine Domäne des konstanten Teils von Immunglobulinen. In diesem Sinne sind bspw. auch F(ab)₂-Fragmente und scFv (single chain Fragmente) Antikörper im Sinne der vorliegenden Erfindung.

25 Dabei bedeutet ein „Antikörper gegen das Leptin-Bindungsprotein, der gegen die Bindungsstelle des Liganden auf dem Leptin-Bindungsprotein gerichtet ist“, dass der Antikörper als bindendes Epitop spezifisch die Bindungsstelle des Liganden auf dem Leptin-Bindungsprotein mit hoher Affinität bindet.

30 Unter „quantitativer Bestimmung“ ist generell jede dem Fachmann bekannte Art der Messung der Menge eines gelösten Analyten in einer Probe zu verstehen.

Explizit gemeint ist damit z.B. die Quantifizierung über chromatographische Methoden mit einem mitlaufenden Standard und insbesondere die über die hochaffine Wechselwirkung zwischen Antikörper und Ligand (Antigen) erfolgende Quantifizierung durch kompetitive Assays oder Bindungsassays, wie z.B. einen Sandwich-Assay auch im ELISA-Format. Ein besonderer Vorteil dieser Erfindung ist es, dass das vorgestellte Verfahren des Antikörperzusatzes mit praktisch jedem bekannten - insbesondere kommerziell erhältlichen - Testkit bzw. Testsystem zur quantitativen Analyse des jeweiligen Analyten (Liganden) ohne größeren Aufwand kombiniert werden kann.

Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn in dem erfindungsgemäßen Verfahren der Antikörper A vor oder während, vorzugsweise vor, der quantitativen Bestimmung zugesetzt wird und/oder mit der Probe inkubiert wird.

Dabei versteht man unter „Inkubation“ eine Reaktionsbedingung, bei der Reaktionspartner, hier Antikörper A und Leptin-Bindungsprotein sowie sekundär auch der Ligand, miteinander eine Reaktion eingehen können. Die Inkubation ist meist zeitlich begrenzt, hier beispielsweise 6, 12, 18 oder 24 h. Insbesondere ist hier unter Inkubation die Vorinkubation - beispielsweise über 6, 12, 18 oder 24 h - zu verstehen, die vor Beginn der quantitativen Messung (beispielsweise mit einem kommerziell erhältlichen Testkit) erfolgt.

Ebenso ist es bevorzugt, wenn die im erfindungsgemäßen Verfahren gemessene Probe Flüssigkeit, bevorzugt Körperflüssigkeit, besonders bevorzugt humane Körperflüssigkeit, insbesondere Blut bzw. humanes Blut, enthält.

Unter „Körperflüssigkeit“ versteht man jede aus dem Körper eines Vertebraten, insbesondere eines Säugetieres, insbesondere eines Menschen gewonnene Flüssigkeit. Das wäre im Falle des Menschen beispielsweise Blut, Urin oder Lymphe, aber auch zytosolische Präparationen aus menschlichen Zellen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Leptin-Bindungsprotein ein physiologischer Partner des Liganden.

Die erfindungsgemäße Methode ist auch dann sinnvoll, wenn Ligand und/oder
5 Leptin-Bindungsprotein von außen (exogen) zugesetzt wurde, z.B. also nach Injektion oder anderweitiger Aufnahme von beispielsweise Leptin als Liganden bei Patienten oder Probanden.

Unter einem „physiologischen Liganden“ ist ein Ligand im oben angegebenen
10 Sinne zu verstehen, der, ohne von außen zugesetzt zu sein, im Körper eines Vertebraten, insbesondere in einer Körperflüssigkeit, auftritt. Entsprechendes gilt für das physiologische Leptin-Bindungsprotein, wobei dieses auch das natürliche unter physiologischen Bedingungen auftretende Leptin-Bindungsprotein des physiologischen Liganden ist.

15 Weiter ist es bevorzugt, wenn das im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Leptin-Bindungsprotein löslich ist, vorzugsweise ein löslicher Rezeptor oder ein Hormon-Bindungsprotein ist.

20 Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Ligand eine peptidische Verbindung und/oder ein Hormon, vorzugsweise ein peptidisches Hormon, insbesondere Leptin.

Dabei versteht man unter „peptidisch“ jede Verbindung, deren Bestandteile über-
25 wiegend über eine peptidische Bindung $R_1-NH-C(O)-R_2$ miteinander verknüpft sind.

Unter „Hormon“ versteht man einen chemischen Botenstoff, der in Abstand zu seinem Synthese- und Freisetzungsort wirkt. Dabei werden Hormone vorzugswei-
30 se von endokrinen Drüsen, bspw. Hypophyse, Keimdrüsen oder Epiphyse hergestellt. Beispiele sind Wachstumshormon oder luteinisierendes Hormon LTH, Insulin, Melatonin, Glucagon, Gastrin, Angiotensin, Substanz P, Interleukine, Va-

sopressin, Endorphine, Enkephaline, Relaxin, der atrionatriuretische Faktor oder auch Leptin. Hormonbindungsproteine sind entsprechend Bindungsproteine (s.o.), die affine Hormone binden.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Ligand humanes Leptin und das Leptin-Bindungsprotein humanes Leptin-Bindungsprotein und der Antikörper A gegen die Bindungsstelle des Leptins auf dem Leptin-Bindungsprotein gerichtet.

10 Besonders bevorzugt ist es, wenn der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Antikörper A ein monoklonaler Antikörper bzw. ein Antikörperfragment oder ein single-chain Antikörper ist. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn der verwendete Antikörper A ZMC2 ist. ZMC2 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die Bindungsstelle des humanen Leptins auf dem humanen Leptin-Bindungsproten gerichtet ist und wurde im Rahmen der Erfindung zur Lösung der
15 Aufgabe optimiert.

Weiter ist es bevorzugt, wenn bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die quantitative Bestimmung des Liganden unter Ausnutzung der Bindung des Liganden als
20 Antigen an einen, vorzugsweise monoklonalen, Antikörper B erfolgt. Dabei ist es in einer Ausführungsform vorteilhaft, wenn die quantitative Bestimmung über einen kompetitiven Bindungstest, vorzugsweise einen „radio-immuno assay“ (RIA), erfolgt. Genauso günstig ist es auch, wenn die quantitative Bestimmung durch Messung eines in Abhängigkeit von der Konzentration des zu messenden Liganden ansteigenden Messparameters erfolgt, vorzugsweise durch einen enzyme-linked immuno sorbent Assay (ELISA) und/oder durch einen entsprechenden
25 Sandwich-Assay.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vor der quantitativen Bestimmung keine Abtrennung des Leptin-Bindungsproteins aus der zu messenden Probe durchgeführt. Darunter versteht man insbesondere, dass es bei der vorliegenden Erfindung unnötig ist, das Lep-
30

tin-Bindungsprotein vor der quantitativen Analyse der Probe aus dieser zu extrahieren, wie dies im Stand der Technik bei anderen Hormonen durchgeführt werden muss. Dabei ist praktisch jede Form von Extraktion denkbar, bei der der zu messende Ligand - wie beispielsweise das Hormon - in der Probe verbleibt, während das Bindungsprotein abgetrennt wird, z.B. durch Fällung und/oder Filtration mit bestimmten Molekulargewichtsausschlussgrenzen, chromatographische Methoden, wie z.B. Affinitätschromatographie oder HPLC, Dialyse bei bestimmten Ligandengrößen etc. Aber genau darauf kann vorzugsweise bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens verzichtet werden, da durch die Wahl des Antikörpers A weder dieser noch der Komplex aus Antikörper A und Leptin-Bindungsprotein an den zu messenden Liganden bindet und damit die Messung nicht mehr behindert oder verfälscht wird, auch wenn das komplexierte Leptin-Bindungsprotein in der Probe verbleibt. Daran ändert auch der Einsatz hochaffiner Antikörper B zur quantitativen Messung nichts, da diese an den zu messenden Liganden und nicht den Antikörper A, das Leptin-Bindungsprotein oder den Komplex aus beiden binden.

Dieser Vorteil tritt insbesondere bei einem besonders günstigen und bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren auf, bei dem der Antikörper A so zugegeben wird, dass der Antikörper A in der Probe nach Zugabe in einer höheren Konzentration als das Leptin-Bindungsprotein vorliegt, vorzugsweise in einer mindestens um 50 %, insbesondere mindestens um 100 %, vorzugsweise mindestens um 200 %, insbesondere mindestens um 400 % höheren Konzentration.

Gerade diese Zugabe des Antikörpers A im Überschuss zum Leptin-Bindungsprotein ist besonders günstig, da bei ausreichendem Überschuss des Antikörpers A sowohl alle Liganden von dem Leptin-Bindungsprotein vollständig verdrängt und somit messbar werden, als auch das Leptin-Bindungsprotein quantitativ komplexiert wird und damit bei der Bestimmung nicht mehr interferiert.

Die genaue, richtige und ausreichende Menge an spezifischem Antikörper A, die der Probe zur möglichst interferenzfreien quantitativen Messung des Liganden

mindestens und evt. höchstens zugesetzt werden muss bzw. kann, kann vom Fachmann in wenigen einfachen Vorversuchen festgelegt werden. Die optimale Zugabe hängt von der Menge an Leptin-Bindungsprotein in der Probe und evt. dem verwendeten quantitativen Testsystem ebenso ab wie möglicherweise von der Menge an zu messendem Liganden.

Die besonders bevorzugte Form des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines Liganden unter Ausnutzung der affinen Bindung des Liganden als Antigen an einen, vorzugsweise monoklonalen, Antikörper B in einer humanes Blut enthaltenden Probe, in welcher der Ligand und ein Leptin-Bindungsprotein in gelöster oder suspendierter Form enthalten sind, bei welcher der zu messenden Probe der gegen die Bindungsstelle des Liganden auf dem Leptin-Bindungsprotein gerichtete Antikörper A, vorzugsweise der hinterlegte monoklonale Antikörper ZMC2, in deutlichem Überschuss gegenüber der Menge an Leptin-Bindungsprotein vor oder während, vorzugsweise vor, der quantitativen Bestimmung des Liganden mittels Antikörper B zugesetzt und inkubiert wird.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Liganden der erfindungsgemäßen Verfahren um Leptin.

Durch die Erfindung wird die Interferenz des Leptin-Bindungsproteins dadurch verhindert, dass ein spezifischer, gezielt gegen das Leptin-Bindungsprotein hergestellter und durch spezifische Experimente charakterisierter, vorzugsweise monoklonaler Antikörper, in hohem Überschuss zu der zu messenden Probe zugesetzt wird. Ein erfindungsgemäßer Antikörper A ist der monoklonale Antikörper ZMC2. Er wurde aufgrund seiner besonders bevorzugten Eigenschaft ausgewählt, dass er auf dem Leptin-Bindungsprotein-Molekül exakt dort bindet, wo das Leptinmolekül ebenfalls bindet. Hierdurch kommt es - wenn man den Antikörper im Überschuss zugibt - zu einer Verdrängung der Leptinmoleküle aus ihrer Bindung an das Leptin-Bindungsprotein. Das so „freigesetzte“ Leptin kann nun ohne sterische Hemmung durch das Leptin-Bindungsprotein in jedem Immunoassay für

Leptin gemessen werden. Da der „Anti-Leptin-Bindungsprotein-Antikörper“ selber nicht mit den zur Messung von Leptin verwendeten „Anti-Leptin-Antikörpern“ interferiert, entfällt auch die Notwendigkeit einer vorgeschalteten Entfernung der Antikörper-Leptin-Bindungsprotein-Komplexe aus der Probe. Praktisch wird der spezielle Anti-Leptin-Bindungsprotein Antikörper ZMC2 mit der Leptin-verdrängenden Eigenschaft der Probe vor der Analyse zugesetzt und die Probe nach Vorinkubation, wie für den jeweiligen Assay vom Hersteller beschrieben, eingesetzt.

Eine weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft einen Antikörper A als Arzneimittel.

Ein noch weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper A sowie gegebenenfalls weitere Wirkstoffe sowie Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

Das Arzneimittel enthaltend mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper A, aber auch ein erfindungsgemäßer Antikörper A alleine sind beispielsweise zum einen zur Behandlung eines Leptin-Überschusses geeignet, da ein Leptin-Rezeptor durch den Antikörper A - vorzugsweise vollständig - blockiert wird, so dass Leptin nicht an diesen Leptin-Rezeptor binden kann und/oder der Antikörper A Leptin, das an ein Leptin-Bindungsprotein gebunden ist, aus dieser Bindung verdrängt.

Entsprechend einer weiteren Ausführungsform kann ein erfindungsgemäßer Antikörper A oder ein Arzneimittel enthaltend mindestens einen Antikörper A grundsätzlich als Leptin-Antagonisten therapeutisch eingesetzt werden oder zur Herstellung eines Arzneimittels dienen, das die physiologische Wirkung des humanen Leptins inhibiert. Dies ist möglich da das Leptin-Bindungsprotein normalerweise ein extrazelluläres Fragment des Leptin-Rezeptors ist und erfindungsgemäß ein Antikörper A an die Bindungsstelle des Leptins am Leptin-Bindungsprotein bindet. Desweiteren bindet Antikörper A sowohl an lösliches Leptin-Bindungsprotein als

auch an den membranständigen Leptin-Rezeptor und zwar in einer solchen Weise, dass der Leptin-Rezeptor für die Anlagerung von Leptin blockiert ist.

Ein Arzneimittel, enthaltend einen oder mehr erfindungsgemäße Antikörper A (und ggf. weitere Hilfs- oder Zusatzstoffe), kann daher auch bei all jenen Erkrankungen zum therapeutischen Einsatz gelangen, bei denen die Wirkung von Leptin in unphysiologischer, bspw. pathologischer Weise, gesteigert ist. Damit ergibt sich erfindungsgemäß auch die Verwendung entsprechender erfindungsgemäßer Antikörper A oder Arzneimittel enthaltend Antikörper A zur Behandlung (bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung) von all jenen Störungen, Erkrankungen oder Pathophysiologien, für die ein Leptin-Überschuss ätiologisch ist, bspw. Erkrankungen des Energiestoffwechsels, krankhafte Essstörungen, wie Anorexie oder Kachexie.

Durch Verabreichung mindestens eines erfindungsgemäßen Antikörpers A oder entsprechender erfindungsgemäßer Arzneimittel können auf diese Art und Weise die Wirkung von pathophysiologisch erhöhten extrazellulären Leptin-Konzentrationen blockiert werden, ohne dadurch die entsprechenden Serumkonzentrationen zu erniedrigen. Es bietet sich daher an, das erfindungsgemäße Arzneimittel bei Erkrankungen wie Anorexia nervosa und bei Kachexie unterschiedlicher Stadien zur Behandlung einzusetzen. Auch die Hypersekretion von Leptin bei Insulin-abhängiger Diabetes mellitus, die für verschiedenste Folgeerkrankungen verantwortlich gemacht wird, kann mit dem erfindungsgemäßen Leptin-Antagonisten bzw. einem Arzneimittel enthaltend mindestens einen Antikörper A behandelt werden.

Gegebenenfalls kann eine Therapie betroffener Patienten mit Leptin-Überschuss in Kombination mit solchen Arzneimitteln oder Wirkstoffen durchgeführt werden, die die Sekretion von Leptin verringern.

Weitere Erkrankungen, bei denen ein erfindungsgemäßes Arzneimittel oder ein erfindungsgemäßer Antikörper eingesetzt werden können oder zur Herstellung eines Arzneimittels dienen können, sind insbesondere verschiedene Zustände,

die mit einer unerwünschten Aktivierung des Immunsystems einhergehen sowie Autoimmunerkrankungen.

Typischerweise wird ein erfindungsgemäßer Antikörper als lyophilisiertes Pulver vorliegen, das zwischen 0,5 mg und 100 mg erfindungsgemäßen Antikörper A, und weitere Zusatzstoffe, bspw. Glycin, Manitol, und/oder Natriumphosphat Monohydrat aufweist. Dieses lyophilisierte Pulver wird in einer geeigneten wässrigen Lösung bereitgestellt und dann, bspw. subkutan ein- oder mehrfach täglich verabreicht.

Prinzipiell können die erfindungsgemäßen Arzneimittel als flüssige Arzneiformen insbesondere in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe sind z.B. Lösungs- oder Verdünnungsmittel, Stabilisatoren, Suspensionsvermittler, Puffersubstanzen, Konservierungsmittel, sowie Farbstoffe, Füllstoffe, und/oder Bindemittel. Die Auswahl der Hilfsstoffe sowie die einzusetzenden Mengen derselben hängt davon ab, ob das Arzneimittel parenteral, intravasal, intravenös, intraperitoneal oder intramuskulär appliziert werden soll. Für alle parenteralen Applikationen eignen sich Zubereitungen in Form von Suspensionen und Lösungen sowie leicht rekonstituierbare Trockenzubereitungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Diagnostikum enthaltend mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper sowie gegebenenfalls Zusatz- und/oder Hilfsstoffe. Unter einem „Diagnostikum“ versteht man eine Zubereitung oder Hilfsmittel mit deren Hilfe beispielsweise eine bestimmte Krankheit diagnostiziert werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit enthaltend voneinander getrennt mindestens eine erste Zubereitung enthaltend mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper A und einen auf der Basis einer Antigen/Antikörper-Reaktion funktionierenden fertigen Testassay zur quantitativen Bestimmung eines Liganden, der in diesem Test als Antigen dient.

Unter einem Kit ist eine gemeinsam auftretende Form verschiedener Bestandteile in einer Verpackungsform zu verstehen. Hier ist es insbesondere ein Diagnostik-Kit, der die verschiedenen notwendigen Bestandteile zur quantitativen Analyse eines Liganden enthält.

5

Bevorzugt ist ein Kit, bei dem die erste Zubereitung einen Antikörper A, der gegen die Bindungsstelle des Liganden, bevorzugt Leptin, besonders bevorzugt humanes Leptin, auf dem, vorzugsweise humanen, Leptin-Bindungsprotein gerichtet ist, enthält und/oder neben der ersten Zubereitung und dem auf der Basis einer Antigen/Antikörper-Reaktion funktionierenden fertigen Testassay zur quantitativen Bestimmung eines Liganden auch eine Zubereitung zur Kalibrierung enthält.

10

15

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßer Kit, in dem die erste Zubereitung den Antikörper ZMC2 (hinterlegt s.o.) enthält und/oder die Zubereitung zur Kalibrierung und/oder der Antikörper in dem beiliegenden auf der Basis einer Antigen/Antikörper-Reaktion funktionierenden fertigen Testassay zur quantitativen Bestimmung eines Liganden, vorzugsweise monoklonaler, Antikörper B gegen den Liganden gerichtet ist. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Liganden um Leptin und der Antikörper B ist gegen die 16 kDa große Hauptisoform des Leptin gerichtet.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung mindestens eines Antikörpers zur, vorzugsweise quantitativen Bestimmung eines physiologischen Liganden, vorzugsweise Leptin, eines physiologischen Leptin-Bindungsproteins.

25

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung mindestens eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen, Störungen oder Pathophysiologien, die auf einem Leptin-Überschuss beruhen, Energiestoffwechselstörungen, insbesondere Essstörungen wie Anorexia nervosa, Kachexie sowie Störungen des Immunsystems, insbesondere unerwünschte Aktivierung des Immunsystems und Autoimmunerkrankungen.

Verwendung mindestens eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder eines Arzneimittels nach Anspruch 20 zur Behandlung von Erkrankungen, Störungen oder Pathophysiologien, die auf einem Leptin-Überschuss beruhen, Energiestoffwechselstörungen, insbesondere Essstörungen wie Anorexia nervosa, Kachexie sowie Störungen des Immunsystems, insbesondere unerwünschte Aktivierung des Immunsystems und Autoimmunerkrankungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers, also eines Antikörpers, der gegen ein Leptin-Bindungsprotein für einen Liganden gerichtet ist, mit folgenden Schritten: (a) Immunisierung von Tieren mit rekombinant hergestelltem Leptin-Bindungsprotein, (b) Isolierung von Immunzellen aus dem Tier, (c) Fusion mit Myelom-Zelllinien zu Hybridomzellkulturen, (d) Selektion von Klonen mit hoher Spezifität für das Leptin-Bindungsprotein. Die Immunisierung kann in allen für derartige Zwecke in Betracht kommenden Tieren erfolgen, also bspw. bei Mäusen, Kaninchen, Schweinen, Pferden etc. Um solche Klone, die Antikörper gegen ein Leptin-Bindungsprotein produzieren, von erfindungsgemäßen Klonen (die Antikörper produzieren, die spezifisch gegen die Ligandenbindungsstelle des Leptin-Bindungsproteins gerichtet sind) zu trennen, werden geeignete Medien (z.B. wells von Mikrotiterplatten, Polystyrolbeads, Plastikröhrchen) mit jeweils einem (unselektierten) anti-Leptin-Fangantikörper in einem Verfahrensschritt (e) beschichtet, und in einem Verfahrensschritt (f) werden das Leptin-Bindungsprotein und nachfolgend der Ligand (z.B. Leptin) hinzugegeben. Hierbei sollte der Ligand markiert sein (bspw. durch Biotinylierung, Label (radiaktiver Label, Fluoreszenzmarker, Enzymmarker (Meerrettich-Peroxidase) etc.)) oder über einen entsprechenden anti-Ligand-Antikörper detektierbar sein, um die Eigenschaft des Liganden, an das Leptin-Bindungsprotein in dem mit Fangantikörper beschichteten Behältnis, überprüfen zu können. Alternative Verfahren sind demnach bspw. Radioaktivität, Chemilumineszenz, kolorimetrische Verfahren oder Enzymreaktion. Nach einem Waschschrift können solche „wells“ oder „beads“ identifiziert werden, die kein Signal nach Ligandenzugabe aufweisen. In diesem Fall blockiert der Fangantikörper die Ligandenbindungsstelle, die Bindungsstelle steht damit für die Liganden-

bindung nicht mehr zur Verfügung, der Fangantikörper interferiert mit dem Liganden.

Schließlich kann ein erfindungsgemäßer Antikörper durch kompetitive Bindungssassays identifiziert werden. Hierzu wird, wie oben beschrieben, beschichtet, allerdings jedes „well“ mit einem nicht spezifisch die Ligandenbindungsstelle er-
kennenden anti-Leptin-Bindungsprotein-Antikörper. Nach Zugabe von Leptin-Bindungsprotein wird in jedes „well“ jeweils ein potentiell interessanter Antikörper (mit der Eigenschaft, die Ligandenbindungsstelle spezifisch zu erkennen) mit
markiertem Liganden hinzugefügt. Mit zunehmender Konzentration des liganden-
bindungsstellenspezifischen Antikörpers nimmt die Signalintensität des Liganden
im „well“ ab. Auf diese Weise können erfindungsgemäße Antikörper gegen einen
Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein selektiert werden.

Alternativ zur Herstellung mit Hilfe von Hybridomen können auch die sogenannten „phage display“ Verfahren (Morphosys oder Cambridge Antibody Technologies) zum Einsatz kommen, um potentiell erfindungsgemäße Antikörper zu generieren und dann, wie oben beschrieben, zu selektieren.

Im folgenden Abschnitt wird die Erfindung weiter durch Ausführungsbeispiele erläutert, ohne sie darauf zu beschränken.

Ausführungsbeispiele und Abbildung:

Abbildung:

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung in Ausführungsbeispiel 2. Die Ergebnisse belegen, dass die Zugabe des erfindungsgemäßen Antikörpers den Einfluss, den Leptin über den Leptin-Rezeptor vermittelt, verringern bzw. aufheben kann.

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1:

Herstellung von Antikörper A (gegen Leptin-BP gerichtet)

5

Mehr als 20 Balb/c Mäuse wurden mit rekombinant hergestelltem Leptin-BP wiederholt nach dem allgemein bekannten Verfahren (siehe Beipackzettel Titermax®) immunisiert. Bei Erreichen eines hohen Titors gegen Leptin-BP wurde die Milz den Tieren entnommen, und es wurden nach dem von Köhler und Milstein (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 1975, Aug. 7; 256 (5517): 495-7) beschriebenen Verfahren durch Fusion mit einer Maus-Myelom-Zelllinie Hybridomzellkulturen hergestellt. Ebenfalls nach allgemein bekannten Verfahren (Limitierende Verdünnung (limited dilution), Screening der Hybridomzellkultur-Überstände mit markiertem Antigen) wurden solche Klone selektiert, die monoklonale Antikörper hoher Affinität und Spezifität für Leptin-BP produzierten.

10

20

25

30

Die meisten der selektierten Klone waren gegen solche Epitope auf dem Leptin-BP-Molekül gerichtet, die außerhalb der Bindungsstelle für Leptin liegen. Um erfindungsgemäße Antikörper A zu selektieren, die gegen ein Epitop innerhalb der Bindungsstelle gerichtet sind, wurde zunächst einer der vielen Antikörper, die Leptin-BP außerhalb der Bindungsstelle binden, eingesetzt. Dieser wurde dadurch identifiziert, dass alle monoklonalen Antikörper gegen Leptin-BP (möglichst viele), z.B. jeweils in getrennte Vertiefungen (wells) einer Mikrotiterplatte (Polystyrolplatten mit hochadsorptiver Oberfläche) als Fangantikörper, aufgebracht wurden (alternativ können auch andere Verfahren, z.B. beschichtete Polystyrolbeads, beschichtete Plastikröhrchen etc., zum Einsatz kommen). Daraufhin wurde rekombinantes Leptin-BP dazugegeben, welches an die Beschichtungsantikörper bindet – in zunächst noch unbekannter Ausrichtung (Bindung je nach Epitop innerhalb oder außerhalb der Hormon-Rezeptor-Interaktionsstelle). Schließlich wurde markiertes (in unserem Fall biotinyliertes) Leptin hinzugegeben, welches nun ausschließlich an die Leptin-BP-Moleküle binden kann, deren Bindungsstelle frei

zugänglich ist (d.h., bei denen der Beschichtungsantikörper nicht mit der Leptinbindung interferiert). Die Messung gebundenen Antikörpers erfolgte durch die Zugabe von Streptavidin-Europium, welches an gebundenes biotinyliertes Leptin bindet und in einem Fluorometer vermessen werden kann (zeitaufgelöste Fluoreszenz nach Zugabe von Enhancement-Solution). Alternativ kann dieser Schritt auch mit den analogen Methoden (Radioaktivität, Enzymreaktion/kolorimetrisches Verfahren oder Chemilumineszenz) durchgeführt werden.

Um nun einen Antikörper aufzufinden, der gegen die Bindungsstelle gerichtet ist, wurde eine Mikrotiterplatte mit einem der nach oben angegebenen Verfahren selektierten Antikörper gegen Leptin-BP, der nicht mit der Bindung von Leptin interferiert, beschichtet. Zugabe von Leptin-BP bewirkte, dass die Leptin-BP-Moleküle gerichtet gebunden werden, also mit einer frei zugänglichen Bindungsstelle für Leptin. Nunmehr wurde biotinyliertes Leptin zugegeben und zugleich alle anderen monoklonalen Antikörper gegen Leptin-BP (wieder jeder Antikörper in eine eigene Vertiefung der Mikrotiterplatte). Wenn nun ein Antikörper gegen die Bindungsstelle gerichtet wäre, sollte er die Bindung von biotinyliertem Leptin konzentrationsabhängig behindern, was an abfallender Signalintensität erkannt werden konnte (Detektionsverfahren in unserem Falle wieder zeitaufgelöste Fluoreszenz (Streptavidin-Europium). Zur Bestätigung wurde im umgekehrten Experiment versucht, biotinylierte Antikörper gegen Leptin-BP durch Zugabe von unmarkiertem Leptin zu verdrängen. Dies ist dann möglich, wenn der biotinylierte Antikörper mit dem nicht-markierten Leptin um die Bindung an die Rezeptorbindungsstelle konkurriert, also das Epitop des mAbs innerhalb der Leptin/ Leptin-Rezeptorinteraktionsstelle liegt.

Ausführungsbeispiel 2:

Nachweis der Wirksamkeit eines erfindungsgemäßen Antikörpers und der damit verbundenen Verbesserung allgemeiner quantitativer Meßmethoden bei störendem Leptin-Bindungsprotein

Leptin-Bindungsprotein wurde auf einer Mikrotiterplatte so immobilisiert, dass die Bindungsstelle für Leptin frei zugänglich ausgerichtet war. Dies geschieht mithilfe eines anderen Antikörpers gegen Leptin-Bindungsprotein, der nicht innerhalb, sondern außerhalb der Hormon-Rezeptor-Interaktionsstelle bindet. Danach wurde markiertes (biotinyliertes) Leptin zugegeben. Nun werden zu den Inkubationen Pufferlösungen mit aufsteigenden Konzentrationen des erfindungsgemäßen Antikörpers ZMC2 zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde die an das immobilisierte Leptin-Bindungsprotein gebundene Menge markierten Leptins durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der spezifisch an das Biotin bindet, gemessen.

Mit aufsteigender Konzentration von ZMC2 nahm die Bindung von biotinyliertem Leptin ab, wodurch der Verdrängungseffekt von ZMC2 bewiesen wurde.

Des weiteren wurde in einem Zellkulturassay die funktionelle Blockade des Leptin-Rezeptors durch ZMC2 nachgewiesen. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit dem humanen Leptin-Rezeptor sowie einem STAT 3-Luziferase-Reporter transfiziert. Dieses Konstrukt ermöglicht die Visualisierung bzw. Messung der durch Leptin ausgelösten intrazellulären Signalkaskadenaktivierung.

Wie in Abbildung 1 gezeigt, führt die Zugabe von Leptin zur Zellkultur zu einer 7-8 fachen Steigerung der Luziferaseaktivität (verglichen mit der Kontrolle ohne Leptin). Die Zugabe des erfindungsgemäßen Antikörpers ZMC2 zum Ansatz (5 µg/ml) verhindert – im Gegensatz zum Kontrollantikörper (Antikörper mit irrelevanter Spezifität, in diesem Fall gegen KLH) – diese Aktivierung.

Patentansprüche

- 5 1. Antikörper A gegen einen Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein, dadurch gekennzeichnet, dass dieser Interaktion des Leptin-Rezeptors und/oder des Leptin-Bindungsproteins mit einem Liganden im wesentlichen vermindert, vorzugsweise verhindert.
- 10 2. Antikörper A nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dieser gegen die extrazelluläre Domäne eines Leptin-Rezeptors, insbesondere gegen ein Leptin-Bindungsprotein, gerichtet ist.
- 15 3. Antikörper A nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass dieser auf einem Leptin-Bindungsprotein an die Bindungsstelle für den Liganden bindet.
4. Antikörper A nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Liganden um Leptin handelt.
- 20 5. Antikörper A nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Leptin-Bindungsprotein um ein in Flüssigkeit, vorzugsweise Körperflüssigkeit, gelöstes oder suspendiertes physiologisches Leptin-Bindungsprotein handelt.
- 25 6. Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen monoklonalen Antikörper handelt.
- 30 7. Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper A ein Antikörperbestandteil, vorzugsweise ein F(ab')₂ Fragment oder ein single-chain Antikörper (scFv) oder ein Antikörperfragment handelt.

8. Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper A der Antikörper ZMC2 ist.

5 9. Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper humanisiert ist und gegen einen humanen Leptin-Rezeptor bzw. ein humanes Leptin-Bindungsprotein gerichtet ist.

10. Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 als Arzneimittel.

10

11. Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines Liganden in einer den Liganden und einen Leptin-Rezeptor und/oder ein Leptin-Bindungsprotein in gelöster oder suspendierter Form enthaltenden Probe, dadurch gekennzeichnet, dass der zu messenden Probe mindestens ein Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, zugesetzt wird.

15

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper A vor oder während, vorzugsweise vor, der quantitativen Bestimmung zugesetzt wird und/oder mit der Probe inkubiert wird.

20

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe Flüssigkeit, bevorzugt Körperflüssigkeit, besonders bevorzugt humane Körperflüssigkeit, insbesondere Blut bzw. humanes Blut, enthält.

25

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Leptin-Bindungsprotein ein physiologischer Partner des Liganden ist.

30

15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Leptin-Bindungsprotein löslich ist, vorzugsweise ein löslicher Leptin-Rezeptoranteil, und/oder ein Hormon-Bindungsprotein, insbesondere ein lösliches Hormon-Bindungsprotein, ist.

16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die quantitative Bestimmung des Liganden unter Ausnutzung der Bindung des Liganden als Antigen an einen, vorzugsweise monoklonalen, Antikörper B erfolgt.

5

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die quantitative Bestimmung über einen kompetitiven Bindungstest, vorzugsweise einen „radio-immuno assay“ (RIA) erfolgt.

10

18. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die quantitative Bestimmung durch Messung eines in Abhängigkeit von der Konzentration des zu messenden Liganden ansteigenden Messparameters erfolgt, vorzugsweise durch einen enzyme-linked immuno sorbent Assay (ELISA) und/oder durch einen Sandwich-Assay.

15

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass vor der quantitativen Bestimmung keine Abtrennung des Leptin-Bindungsproteins aus der zu messenden Probe erfolgt.

20

20. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antikörper A so zugegeben wird, dass der mindestens eine Antikörper A in der Probe in einer höheren Konzentration als das Leptin-Bindungsprotein vorliegt, vorzugsweise in einer mindestens um 50 %, insbesondere mindestens um 100 %, vorzugsweise mindestens um 200 %, insbesondere mindestens um 400 % höheren Konzentration.

25

21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand Leptin ist.

30

22. Arzneimittel enthaltend mindestens einen Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 sowie gegebenenfalls weitere Wirkstoffe sowie Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

23. Diagnostikum enthaltend mindestens einen Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 sowie gegebenenfalls Hilfsstoffe.

5 24. Kit enthaltend voneinander getrennt mindestens eine erste Zubereitung enthaltend mindestens einen Antikörper A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 und einen auf der Basis einer Antigen/Antikörper-Reaktion funktionierenden fertigen Testassay zur quantitativen Bestimmung eines Liganden.

10 25. Kit gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Zubereitung den Antikörper ZMC2 enthält und/oder eine Zubereitung zur Kalibrierung und/oder der Antikörper B, in dem auf der Basis einer Antigen/Antikörper-Reaktion funktionierenden fertigen Testassay zur quantitativen Bestimmung eines Liganden, gegen den Liganden gerichtet ist.

15 26. Kit gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Liganden um Leptin handelt und der Antikörper B gegen die 16 kDa große Hauptisoform des Leptins gerichtet ist.

20 27. Kit gemäß einem der Ansprüche 25 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper B ein monoklonaler Antikörper ist.

25 28. Verwendung mindestens eines Antikörpers A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur, vorzugsweise quantitativen, Bestimmung eines Liganden in einer physiologischen Lösung, welche auch ein physiologisches Leptin-Bindungsprotein enthält.

30 29. Verwendung mindestens eines Antikörpers A gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen, Störungen oder Pathophysiologien, die auf einem Leptin-Überschuss beruhen, Energiestoffwechselstörungen, insbesondere Essstörungen, wie Anorexia ner-

vosa, Kachexie sowie Störungen des Immunsystems, insbesondere unerwünschte Aktivierung des Immunsystems und Autoimmunerkrankungen.

- 5 30. Verwendung mindestens eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder eines Arzneimittels nach Anspruch 22 zur Behandlung von Erkrankungen, Störungen oder Pathophysiologien, die auf einem Leptin-Überschuss beruhen, Energiestoffwechselstörungen, insbesondere Essstörungen, wie Anorexia nervosa, Kachexie sowie Störungen des Immunsystems, insbesondere unerwünschte Aktivierung des Immunsystems und Autoimmunerkrankungen.

10

Aktivierung der
Luciferase
(Vielfaches des
Kontrollwertes)

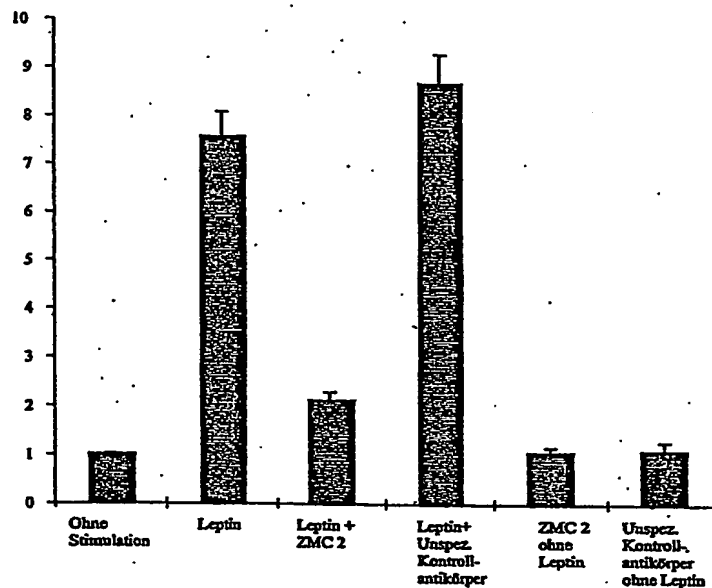


Abbildung 1: Effekt von ZMC 2 auf die Leptininduzierte Signalaktivierung intrazellulär.
Mittelwert (\pm Standardfehler) der korrigierten Luciferaseaktivität in transient transfizierten HEK293 Zellen.

Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung betrifft spezifische Antikörper, insbesondere einen Antikörper spezifisch gegen das Leptinbindungsprotein, sowie die Verwendung dieses Antikörpers bei der quantitativen Analyse, in ausgewählten Indikationen für therapeutische Zwecke und zur Herstellung von Therapeutika. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Leptin in der Probe gelöster oder
- 10 suspendierter Bindungsproteine unter Verwendung spezifischer Antikörper, sowie Diagnostika und (Diagnostik-) Kits enthaltend diesen Antikörper.

Figur

Aktivierung der
Luciferase
(Vielfaches des
Kontrollwertes)

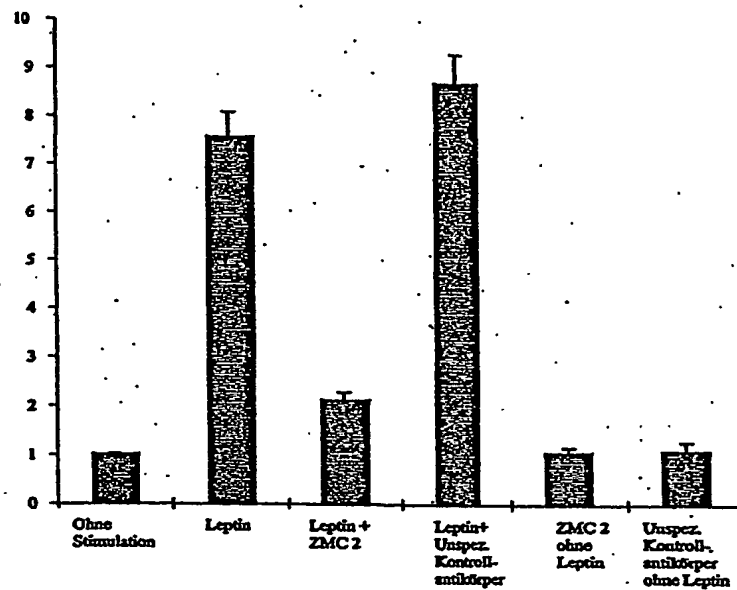


Abbildung 1: Effekt von ZMC 2 auf die Leptininduzierte Signalaktivierung intrazellulär.
Mittelwert (\pm Standardfehler) der korrigierten Luciferaseaktivität in transient transfizierten HEK293 Zellen.

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/013043

International filing date: 17 November 2004 (17.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 103 53 593.4
Filing date: 17 November 2003 (17.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.